

Aus der Abteilung für Kieferchirurgie und plastische
Gesichtschirurgie im Klinikum Steglitz (Leiter:
Prof. Dr. Dr. R. Stellmach) des Fachbereiches
Zahn- Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität
Berlin

Der Einfluß von Bleomycin und Methotrexat
auf die Synthese der Desoxyribonucleinsäure in
Ehrlich Ascites Tumorzellen

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Gerhard Martschke
aus Bautzen

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Kieferchirurgie und plastische
Gesichtschirurgie im Klinikum Steglitz (Leiter:
Prof. Dr. Dr. R. Stellmach) des Fachbereiches
Zahn- Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität
Berlin

Der Einfluß von Bleomycin und Methotrexat
auf die Synthese der Desoxyribonucleinsäure in
Ehrlich Ascites Tumorzellen

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Gerhard Martschke
aus Bautzen

Referent: Privatdozent Dr.Dr.K. Bitter
Korreferent: Professor Dr. Hans - Jörris Risse

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität
Berlin



Promoviert am: 20. Januar 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methode	4
I. Material	4
1. Chemikalien, Pharmaka	4
2. Apparative Ausrüstung	5
3. Ehrlich Ascites Tumorzellen Suspension	6
II. Methode	6
1. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier	6
2. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier und Entwickeln mit Fließmittel	7
3. Effektive Ausbeute von markiertem ^3H und ^{14}C Desoxyuridin (dUR) nach Einbau in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT)	7
a) Markierung	7
b) Nukleotidgewinnung und Trennung	8
c) Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Aufarbeitung	9
4. Doppel-Isotopen-Markierungsmethode	9
5. Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese mit Methotrexat oder Bleomycin oder Methotrexat und Bleomycin	11
C. Ergebnisse	12

I.	Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier	12
II.	Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier und Entwickeln mit Fließmittel.	12
III.	Effektive Ausbeute von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Einbau in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT)	16
IV.	Untersuchungen des Einbaus von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT) mit Hilfe der Doppel - Isotopen - Markierungsmethode	20
V.	Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese mit Methotrexat	24
VI.	Einfluß von Bleomycin auf die Markierung des Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Syntheseweges	24
VII.	Einfluß von Methotrexat und Bleomycin auf die Markierung des Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Syntheseweges	25
D.	Diskussion	29
E.	Zusammenfassung	33
F.	Literaturverzeichnis	34

A. Einleitung

Bei der Behandlung bösartiger Tumoren werden bis heute hauptsächlich chirurgische und radiologische Methoden angewandt. Die medikamentöse Behandlung dagegen steht noch sehr im Hintergrund, da eine Dauerheilung mit ihr noch nicht beobachtet werden konnte. Allerdings sind auf dem Gebiet der Chemotherapie bösartiger Tumoren in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht worden. So wurden neue Zytostatika entdeckt, deren Wirkung auf bösartige Tumoren die Hoffnung aufkommen läßt, bösartige Geschwülste auch unter alleiniger Anwendung der medikamentösen Behandlung zu heilen. Zu diesen Zytostatika gehören der Antimetabolit Methotrexat und das Antibiotikum Bleomycin.

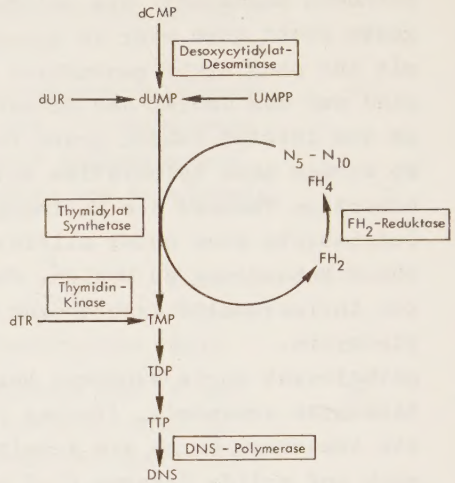
Methotrexat wurde zunächst bei der Behandlung kindlicher Leukämien angewandt. (Farber 1949). Später erweiterte sich die Anwendung durch die Arbeiten von Bertino und Mitarbeiter auch auf solide Tumoren (5,7,9,14,28,30,32). Heute ist es wegen seiner Wirkung besonders auf Plattenepithelkarzinome im Kopf - Halsbereich bekannt.

Bleomycin wird besonders im Plattenepithel angereichert (15). Diese Entdeckung veranlaßte Ischikawa, Bleomycin zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen zu versuchen, da sich seine Wirkung ja besonders hier, wo es angereichert wird, entfalten müßte. Erste Behandlungsergebnisse erwiesen sich als so positiv, daß Bleomycin sofort als Medikament angewandt wurde (1,8,17,35). Heute gilt es, ebenso wie Methotrexat, als bedeutsames Zytostatikum.

Bleomycin und Methotrexat unterscheiden sich in ihrem molekularem Wirkmechanismus. Der Wirkungsmechanismus von Methotrexat beruht auf einer kompetitiven Hemmung des Enzyms Dihydrofolat - Reduktase. Als Folge wird die Methylierung von Desoxyuridin - 5' - Monophosphat (dUMP) zu Thymidin - 5' - Monophosphat (TMP), dadurch die Desoxyribonucleinsäure - Bildung (DNS) und schließlich die Zellproliferation gehemmt (Abb.1). Die Ursache

dieser Hemmung liegt darin, daß Methotrexat eine 20.000 mal stärkere Affinität zum Enzymprotein besitzt als Dihydrofolsäure. (38,40,41)

Abb.1:
Ausschnitt aus der
Desoxyribonuklein -
säure - Synthese (DNS)



Der genaue Wirkungsmechanismus von Bleomycin ist noch nicht geklärt. Zwei Wirkungsweisen stehen zur Debatte. Zum einen soll Bleomycin das Enzym DNS - Polymerase hemmen, also in Abb.1 den Schritt von Thymidin - Triphosphat zur DNS, zum anderen soll Bleomycin das bereits fertig synthetisierte DNS - Molekül zerstören. (10,11,18-27,32-34, 36-39)

Beide Zytostatika reduzieren also letztlich den DNS - Gehalt der Zelle, greifen aber unterschiedlich in den Stoffwechsel der Zelle ein. Methotrexat und Bleomycin einzeln angewandt, erzielen eine Remission bei Plattenepithelkarzinomen bis zu 60% (5,17), so daß von einer alleinigen Behandlung mit diesen beiden Zytostatika abgesehen werden muß. Hier bietet sich nun an, beide Medikamente kombiniert anzuwenden, in der Hoffnung ihre Hemmeffekte auf den Stoffwechsel der Tumorzelle derart zu steigern, daß man von einer Addition oder gar Potenzierung der Wirkungen sprechen kann.

in folgendem soll untersucht werden, ob die gleichzeitige Anwendung von Methotrexat und Bleomycin den erhofften verstärkten Einfluß auf den DNS - Gehalt der Tumorzelle bewirkt. Gleichzeitiges Ziel dieser Arbeit ist es, möglichst den genauen Angriffspunkt des Bleomycins auf den Zellstoffwechsel zu finden. Die Untersuchung wird an Ehrlich - Aszites - Tumorzellen (EAT) durchgeführt.

B. Material und Methode

I. Material

1. Chemikalien, Pharmaka

Desoxyuridin (dUR) ^{14}C (61 m Ci/m M)
dUR ^3H (24 Ci/m M) und Toluol Standard ^{14}C
($5,71 \times 10^5$ dpm/g)
(Radiochemical Center, Amersham/England
und NEN - New England Nuklear -, Boston,
Abany Str.)

Methotrexat (Lederle, München)
Formel siehe Seite 4 a

Bleomycin (Heinrich Mack, Illertissen)
Formel siehe Seite 4 a

Dioxan Scintillationsflüssigkeit:

Methanol	100 ml
Äthylen Glycol	20 ml
Naphtalin	60 g
2,5 - Diphenyloxazol (PPO)	4 g
2,2' - para - Phenylen - bis	
- 5 - Phenylloxazol (POPOP)	0,2g
ad 1000 ml Dioxan	

Toluol Scintillationsflüssigkeit:

2,5 - Diphenyloxazol (PPO)	5 g
2,2' - para - Phenylen - bis	
- 5 - Phenylloxazol (POPOP)	0,3g
ad 1000 ml Toluol	

Fließmittel:

4 N HCOOH in 0,1 m HCOONH₄

Hank'sche Lösung: "

NaCl	8 g/l
KCl	0,4 g/l
CaCl ₂	0,14g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	0,12g/l
KH ₂ PO ₄	0,06g/l
NaHCO ₃	0,35g/l
Glucose	1 g/l

Als Chromatographie - Papier wurde Whatman Chromatography Paper DE 81 benutzt.

2. Apparative Ausrüstung

Die Inkubation wurde bei 37°C in einem Köttermann Schüttel - Inkubator vorgenommen.

Als Zentrifuge diente die Servall Refrigerated Automatic.

Zum Homogenisieren wurde der Ultra - Turrax (Janke & Kunkel., Staufen i. Br.) verwendet.

Homogenate wurden mit Hilfe des Glashomogenisators mit Teflon Pistill nach Potter - Elvehjem (B. Braun, Melsungen) hergestellt.

Gefriertrocknung fand statt in einer Leybold Gefriertrocknungsanlage GT 1,5.

Die Lokalisation der radioaktiven Flecken auf dem Chromatogramm erfolgte mit Packard Radio - chromatogramm Scanner Modell 7201.

Tricarb Scintillation Spectrometer: Packard Tricarb Modell 3380.

3. Ehrlich Ascites Tumor Suspension (EAT - Suspension) :

Ehrlich Ascites Karzinomzellen wurden von weiblichen weißen Mäusen (CF 1 Mäuse vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Gewicht 23 - 25 g), denen sechs Tage vorher 0,1 ml unverdünnte Ascites - Flüssigkeit überimpft worden war, gewonnen. Die Tiere wurden getötet, die Ascites - Flüssigkeit mittels Tuberkulin - Spritze entnommen. Die Tumorzellen wurden durch Zentrifugieren (Ecco Superior IV B Zentrifuge, 5' bei 3000 U/min) gesammelt und dreimal in Hankscher Lösung bei 4°C gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann mit Eagles Minimum Essential Medium (MEM) + 10 % foetales Kälberserum zu einer 20% - igen Suspension verdünnt.

II. Methode

1. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier

Es wurden zwei Verdünnungsreihen angesetzt:

A. 10 μl dUR ^{14}C (10 μl $\hat{=}$ 0,62 μCi) wurde mit H_2O schrittweise 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 verdünnt

B. 10 μl dUR ^3H (10 μl $\hat{=}$ 5,5 μCi) wurde mit H_2O schrittweise 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 verdünnt.

10 μl der Verdünnungen A, 10 μl der Verdünnungen B sowie 10 μl der Verdünnungen A und B gemischt, wurden punktförmig auf Chromatographie - Papier (Whatman, DE 81) aufgetragen. Nach Trocknung wurden die aufgetragenen Verdünnungen 2 cm^2 groß ausgeschnitten, in Packard - Töpfchen gegeben, mit 10 ml Toluol - Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Tricarb Scintillation - Spectrometer gemessen. Wenn in den jeweiligen Meßwerttabellen nicht anders angegeben, erfolgte die Messung in den Doppelnuklidkanälen ^{14}C (^3H) und ^3H (^{14}C).

Die Verdünnungen wurden dreimal angesetzt, auf Chromatographie - Papier aufgetragen und gemessen. Tabelle I zeigt die Mittelwerte.

2. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Auftragen auf Chromatographie - Papier und Entwickeln mit Fließmittel

Verdünnungsreihen von dUR ^{14}C und dUR ^3H wurden angesetzt und auf Chromatographie - Papier aufgetragen wie bereits unter 1 beschrieben. Nach Auftragen der markierten Prekursoren wurde das Chromatographie - Papier in eine Papier - Chromatogramm - Fließkammer gehängt und mit Fließmittel 4 N HCOOH in 0,1 M HCOONH_4 entwickelt. Die Entwicklung betrug ca. 5 Std. Danach wurde das Rest - Fließmittel abgesaugt. Nach Trocknung wurde das Chromatographie - Papier in ein Packard Radiochromatogramm gespannt und so mittels Scanning die Stelle ermittelt, an der sich die Hauptaktivität des markierten Prekursors befand. An dieser Stelle wurde eine 2 cm^2 große Fläche aus dem Chromatographie - Papier ausgeschnitten, in einen Packard - Topf gegeben, mit 10 ml Toluol Scintillations - flüssigkeit versetzt und im Tricarb - Scintillation - Spectrometer gemessen. Tabelle II zeigt die Mittelwerte von drei Ansätzen. Kanäle s. II 1.

3. Effektive Ausbeute von markiertem ^3H und ^{14}C Desoxyuridin (dUR) nach Einbau in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT)

a.) Markierung:

In Erlenmeyerkolben (10 ml) wurde 1,5 ml einer 20 % - igen EAT - Zellsuspension gegeben. Die Erlenmeyerkolben standen in Eiswasser und wurden vor und nach Zugabe von Zellsuspendat mit 5 % CO_2 Luftgemisch begast, um den pH - Wert (7,4) konstant zu halten. Zu den Zellsuspensionen wurde 0,1 ml dUR ^{14}C (100 $\mu\text{l} \hat{=} 6,2 \mu\text{Ci}$) bzw dUR ^3H (100 $\mu\text{l} \hat{=} 55 \mu\text{Ci}$) gegeben. Die Erlenmeyerkolben wurden verschlossen. Die Suspensionen wurden auf - gequirlt und anschließend 10 min. bzw 30 min. bzw 60 min. bei 37° C in einem Inkubator geschüttelt. Die Inkubation wurde beendet, indem die Erlenmeyerkolben in Eiswasser zurückgestellt wurden.

b.) Nukleotidgewinnung und Trennung:

Jeweils 1 ml der Ansätze wurde in ein Schliffglas (10 ml) überführt und 5 min. bei 3000 U/min zentri - fugiert. (Servall Refrigerated Automatic). Die rück - ständigen Zellen wurden mit 5 ml Trichloressigsäure (TCE) (10%-ig, 4°C) aufgequirt und homogenisiert (Potter). Danach wieder bei 3000 U/min 5 min. zentri - fugiert. Der Überstand, also die säurelösliche Fraktion, wurde dreimal mit Äther gewaschen, wodurch die TCE ent - fernt wurde. Die übrigbleibende wässrige Fraktion wurde in Schliffkolben (50 ml) überführt, mit flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und lyophilisiert. Die ge - wonnene Trockensubstanz wurde mit 0,1 ml Aqua dest. gelöst und 0,05 ml strichförmig auf Chromatographie - Papier aufgetragen. Um den Laufweg der Nukleotide später feststellen zu können, wurden inaktive Referenzsubstanzen (dUR, dUMP + TMP, TDP und TTP) punktförmig auf das Chromatographie - Papier aufgetragen. Papierchromato - graphie nach Ives, Potter und Morse (16), absteigend mit Fließmittel 4 N HCOOH in 0,1 M HCOONH₄ . Nach Trocknung des Chromatographie - Papiers wurde der Laufweg der Referenz - substanz unter UV-Lichtbestrahlung ermittelt und ihre fleckförmige Ausbreitung eingezeichnet. Der Standort der markierten Nukleotide wurde durch Vergleich mit dem Stand - ort der eingezeichneten Referenzsubstanzen festgestellt (Abb.2). Um zu ermitteln, wo sich die meiste Aktivität der fleckförmig ausgebreiteten Nukleotide befand, wurde das Chromatographie - Papier in ein Packard Radiochromato - gramm gespannt und die Strahlung der einzelnen Nukleotide festgehalten (Abb. 2). Die markierten Nukleotide wurden in Höhe der Peaks 2 cm² groß aus dem Chromatographie - Papier ausgeschnitten, in Packard Töpfe gegeben, mit 10 ml Toluol Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Tricarb Scintillation - Spectrometer gemessen: Kanäle s. II 1.

c.) Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Aufarbeitung:

Das saureunlösliche Sediment, das nach dem Homogenisieren und anschließenden Zentrifugieren zurückgeblieben war, wurde mit 1 ml TCE (10%-ig, 4°C) versetzt, aufgegüßelt und 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment mit 2 ml Ethanol (96%-ig, 4°C) versetzt, aufgegüßelt und 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert. Dieses Waschen mit TCE und Ethanol wurde wiederholt. Das Sediment wurde mit 2 ml TCE (10%-ig, 4°C) versetzt und für 15 min. auf 90° im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen im Eiswasser wurde 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand durch dreimaliges Waschen mit Äther von der TCE getrennt. 0,5 ml der Lösung wurde in ein Packard Töpfchen gegeben und mit 10 ml Dioxan Scintillations - Flüssigkeit versetzt, anschließend im Tricarb Scintillation - Spectrometer gemessen. Kanäle s. II 1. Korrektur der Überstrahlung mit Hilfe des "Internal Standard" s.u.

4. Doppel - Isotopen - Markierungsmethode

Prinzip:

Kontrollzellen werden mit einem Prekursor, der mit einem Isotop, hier ^{14}C , markiert wurde, inkubiert, während Probezellen, die mit dem gleichen Prekursor, jedoch ^3H markierten, inkubiert werden. Die Inkubationszeit der Kontrollzellen ist immer dieselbe (10'), während die der Probezellen variiert, hier 10 min., 30 min. und 60 min. Nach der Inkubation werden Kontroll- und Versuchszellen zusammengegeben. Durch dieses Poolen treten Radioaktivitäts - verluste in Kontroll- und Probezellen während der Aufarbeitung gleichmäßig ein und können deshalb als Fehler vernachlässigt werden. DNS und saurelösliche Fraktion werden aufgearbeitet und in letzterer die dUR - Nukleotide chromatographisch getrennt. Aus den korrigierten Meßwerten der beiden Isotope werden $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ Quotienten für die DNS und Nukleotide gebildet.

Das Verfahren war folgendes:

In 24 Erlenmeyerkolben (10 ml) wurde jeweils 1,5 ml einer 20%-igen EAT - Zellsuspension gegeben. Die Erlenmeyerkolben standen in Eiswasser und wurden vor und nach Zugabe von Zellsuspendat mit 5% CO₂ begast. Anschließend mittels Gummikorken verstopft. In zwölf dieser Erlenmeyerkolben wurde dann 0,1 ml dUR¹⁴C (100 μ l $\hat{=}$ 5 μ Ci) gegeben. Diese mit dUR¹⁴C markierten Ansätze galten als Kontrollen. In die übrigen zwölf Erlenmeyerkolben wurde 0,01 ml dUR³H (10 μ l $\hat{=}$ 10 μ Ci) gegeben. Diese Ansätze galten als Proben. Die Ansätze wurden aufgewirbelt. Alle Kontrollansätze und ein Drittel der Probeansätze wurden 10 min., ein Drittel der Probeansätze 30 min. und ein Drittel der Probeansätze 60 min. lang bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Inkubation wurde beendet, indem die Ansätze in Eiswasser gestellt wurden. Die Kontroll- und Probeansätze wurden nun gepoolt, indem jeweils 1 ml der Kontrollansätze mit 1 ml der Probeansätze gemischt wurde, d.h. 1 ml des Kontrollansatzes 1 mit 1 ml des Probeansatzes 1; 1 ml des Kontrollansatzes 2 mit 1 ml des Probeansatzes 2 usw. Nach dem Poolen wurden die Ansätze aufgearbeitet wie bereits beschrieben.

Überstrahlung

Meßtechnisch bedingt kommt es im Tricarb Scintillation - Spectrometer zu Überstrahlung von ¹⁴C - Aktivität auf die ³H - Aktivität. Die ³H - Werte sind um diesen Betrag der Überstrahlung zu hoch und müssen entsprechend korrigiert werden.

Zu den bereits im Tricarb Scintillation Spectrometer gemessenen Nukleotiden wurde 100 μ l Toluol + Standard - ¹⁴C (5,71 x 10⁵ dpm/g, bei 20 - 25°C : 0,86g = 1 ml) hinzugegeben und die Nukleotide erneut im Tricarb Scintillation - Spectrometer gemessen ("Internal Standard"). Die Berechnung der Überstrahlung war folgende:

$$\begin{aligned} \text{cpm } ^{14}\text{C} + \text{Toluol Standard} - ^{14}\text{C} \text{ minus cpm } ^{14}\text{C} &= a \\ \text{cpm } ^3\text{H} + \text{Toluol Standard} - ^{14}\text{C} \text{ minus cpm } ^3\text{H} &= b \end{aligned}$$

$a \hat{=}$ 100%-ige Strahlung

$b \hat{=}$ v

$$\frac{b \times 100}{a} = \% \text{ Überstrahlung}$$

Die prozentuale Überstrahlung von ^{14}C - Aktivität auf ^3H - Aktivität wurde von allen ^3H - cpm Werten subtrahiert, bevor der Quotient $\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ gebildet wurde.

Eine Überstrahlung von ^3H - Aktivität auf ^{14}C - Aktivität tritt bei der gewählten Kanalschaltung nicht ein, wes - wegen die ^3H - Werte nicht korrigiert zu werden brauchen.

5. Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese mit Methotrexat oder Bleomycin oder Methotrexat und Bleomycin

Bei den Hemmversuchen wurde in jeweils die Hälfte der Probeansätze 50 μl Methotrexat (10^{-4}M/l) bzw. 50 μl Bleomycin (100 $\mu\text{g/ml}$ Suspension in Aqua dest. gelöst) bzw. gleichzeitig 50 μl Methotrexat (10^{-4}M/l) und 50 μl Bleomycin (100 $\mu\text{g/ml}$ Suspension - Aqua dest. gelöst) zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe der markierten Prekursoren. Pro Versuch ergaben sich somit jeweils zwei Ansätze, die gehemmt waren und zwei Ansätze, die nicht gehemmt waren und zwar pro Inkubationszeit von 10 min., 30 min. und 60 min. Die weitere Verarbeitung der Ansätze erfolgte wie bereits beschrieben.

C. Ergebnisse

I. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin nach Auftragen auf Chromatographie - Papier.

Wie in Tabelle I gezeigt wird, verringert sich die effektive Ausbeute in cpm proportional den schrittweisen Verdünnungen. Die effektive Ausbeute in % bleibt bei den schrittweisen Verdünnungen relativ konstant. Der Betrag der effektiven Ausbeute ist hoch bei dem mit ^{14}C markiertem dUR und beträgt $\sim 50\%$. Gering dagegen ist die Ausbeute bei dem mit ^3H markiertem dUR. Hier beträgt sie nur $\sim 3,5\%$. Dies ist durch den Unterschied der Strahlenenergie zwischen ^3H und ^{14}C erklärt. Die Radioaktivitätsverluste betragen bei dUR ^{14}C 50% , bei dUR ^3H dagegen $96,5\%$, sie sind der effektiven Ausbeute umgekehrt proportional. Die relativ geringe ^{14}C - Radioaktivität bei dem kombinierten Ansatz ($10\mu\text{l}$ dUR ^{14}C + $10\mu\text{l}$ dUR ^3H) ist meßtechnisch bedingt, da das Spektrum halbiert wird, so daß nur ein Teil der vorhandenen ^{14}C - Radioaktivität gemessen wird.

II. Radioaktivitätsmessungen verschiedener Verdünnungen von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin nach Auftragen auf Chromatographie - Papier und Entwickeln mit Fließmittel.

In Tabelle II verringert sich die effektive Ausbeute gegen - über Tabelle I nicht mehr proportional den schrittweisen Verdünnungen, sondern unterschiedlich stark. Auch bleibt die Ausbeute in % bei den schrittweisen Verdünnungen nicht konstant, sondern variiert. Die absoluten Werte der effektiven Zähl ausbeute in cpm und % verringern sich gegenüber Tabelle I auffällig. Der Grund dafür liegt darin, daß sich der markierte Prekursor beim Wandern mit dem Fließmittel von der punktförmigen Auftragung fleckförmig vergrößert. Nach Trocknung des Chromatographie - Papiers wird aber nicht der gesamte

Prekursorfleck ausgeschnitten, sondern nur eine 2 cm² große Fläche. Es bleibt also ein Teil der aufgetragenen Prekursoraktivität auf dem Chromatographie - Papier zurück.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde die Aktivität der zugegebenen Prekursoren für die folgenden Untersuchungen erhöht.

Tabelle I :

Ansatz (10 μ l dUR ¹⁴ C)	Ausbeute ¹⁴ C (cpm)	Ausb. (%)	Schaltung
1 : 10	60676	44,4	Kanal ¹⁴ C
1 : 100	7369	54,02	
1 : 1000	736	53,9	
1 : 10000	68	49,85	
1 : 100000	6,6	48,38	

Ansatz (10 μ l dUR ³ H)	Ausbeute ³ H (cpm)	Ausb. (%)	Schaltung
1 : 10	40679	3,3	³ H - Kanal
1 : 100	4140	3,42	
1 : 1000	445	3,67	
1 : 10000	61	5,0	
1 : 100000	/	/	

Ansatz (10 μ l dUR ¹⁴ C + 10 μ l dUR ³ H)	Ausbeute (cpm)	Ausb. Ausbeute ³ H (%) (cpm)	Ausb. (%)	Schaltung
1 : 10	24448	17,91 44140	3,88	¹⁴ C (³ H)
1 : 100	2313	17,0 4761	3,93	bzw.
1 : 1000	235	17,22 504	4,17	³ H (¹⁴ C) -
1 : 10000	17	12,46 66	5,44	Kanal
1 : 100000	/	/		

Effektive Zählausbeute in cpm und % der eingesetzten Mengen dUR¹⁴C (10 μ l $\hat{=}$ 0,62 μ Ci) und dUR³H (10 μ l $\hat{=}$ 5,5 μ Ci) nach Auftragen verschiedener Verdunnungen auf Chromatographie - Papier und Messung im Tricarb Scintillation - Spectrometer.

Tabelle II :

Ansatz	Ausbeute ^{14}C	Ausb.
(10 μl dUR ^{14}C)	(cpm)	(%)
1 : 10	10802	7,9
1 : 100	677	4,9
1 : 1000	58	4,2

Ansatz	Ausbeute ^3H	Ausb.
(10 μl dUR ^3H)	(cpm)	(%)
1 : 10	10255	0,84
1 : 100	128	0,1
1 : 1000	82	0,67

Ansatz	Ausbeute ^{14}C	Ausb.	Ausbeute ^3H	Ausb.
(10 μl dUR ^{14}C + 10 μl dUR ^3H)	(cpm)	(%)	(cpm)	(%)
1 : 10	9414	6,9	9339	0,77
1 : 100	3991	29,25	3977	3,28
1 : 1000	239	17,5	257	2,12

Effektive Zählausbeute in cpm und % der eingesetzten Mengen dUR ^{14}C (10 μl $\hat{=}$ 0,62 μCi) und dUR ^3H (10 μl $\hat{=}$ 5,5 μCi) bei verschiedenen Verdünnungen nach Auftragen auf Chromatographie - Papier, Entwickeln mit Fließmittel und Messung im Tricarb - Scintillation - Spectrometer. Kanäle ^{14}C (^3H) und ^3H (^{14}C)

III. Effektive Ausbeute von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) nach Einbau in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT)

Tabelle III zeigt, daß die DNS - Werte den schrittweisen Erhöhungen der Inkubationszeiten proportional sind. Je länger also die EAT - Zellen mit den markierten Prekursoren inkubiert werden, um so höher ist der Einbau der Radioaktivität der Prekursoren in die Zellen und damit in die DNS. Die höhere spezifische Aktivität von dUR ^3H (100 μl = 55 μCi) gegenüber dUR ^{14}C (100 μl = 6,2 μCi) kommt auch in den DNS - Werten bei der Inkubationszeit von 10 Min. zum Ausdruck. Die DNS - Werte der mit dUR ^3H inkubierten Zellen sind höher als die DNS - Werte der mit dUR ^{14}C inkubierten Zellen. Die absoluten Werte der chromatographisch getrennten Nukleotidschwanken sehr stark. (Trotz schrittweiser Erhöhung der Inkubationszeiten ist hier eine proportionale Steigerung der Nukleotidwerte nicht zu erkennen). Trotz gleicher Ansätze zeigen die Nukleotidwerte große Unterschiede. Diese Abweichungen der Werte sind durch unterschiedliche Aktivitätsverluste während der Aufarbeitung, besonders durch das Papier - Chromatographie - Trennverfahren für die Nukleotide zu erklären. Um diese Schwankungen der Werte bzw. die unterschiedlichen Aktivitätsverluste durch die Aufarbeitung auszuschalten, wurde für die folgenden Untersuchungen die Doppel - Isotopen - Markierungsmethode gewählt.

Ansatz	Nukleotide	Ausbeute cpm	Ansatz	Nukleotide	Ausb. cpm
100 μ l	dUR	88397	100 μ l	dUR	49702
dUR ¹⁴ C	dUMP + TMP	821	dUR ³ H	dUMP + TMP	586
Inku-	TDP	32551	Inku-	TDP	8797
bation	TTP	19144	bation	TTP	1994
10'	DNS	25661	30'	DNS	105313
100 μ l	dUR	40655	100 μ l	dUR	37079
dUR ¹⁴ C	dUMP + TMP	692	dUR ³ H	dUMP + TMP	387
Inku-	TDP	30310	Inku-	TDP	7710
bation	TTP	5453	bation	TTP	3378
10'	DNS	20103	30'	DNS	90830
100 μ l	dUR	60791	100 μ l	dUR	48044
dUR ³ H	dUMP + TMP	498	dUR ³ H	dUMP + TMP	242
Inku-	TDP	10002	Inku-	TDP	7262
bation	TTP	2602	bation	TTP	5481
10'	DNS	37081	60'	DNS	125175
100 μ l	dUR	235	100 μ l	dUR	49165
dUR ³ H	dUMP + TMP	4359	dUR ³ H	dUMP + TMP	675
Inku-	TDP	17733	Inku-	TDP	5688
bation	TTP	1941	bation	TTP	15568
10'	DNS	35430	60'	DNS	114068
100 μ l	dUR	36590	100 μ l	dUR	68983
dUR ³ H	dUMP + TMP	697	dUR ³ H	dUMP + TMP	71
Inku -	TDP	4957	Inku -	TDP	6468
bation	TTP	5322	bation	TTP	13112
30'	DNS	108302	60'	DNS	126001

Tabelle III :

Effektive Ausbeute in cpm nach Inkubation von EAT-Zellen mit dUR¹⁴C (100 μ l $\hat{=}$ 6,2 μ Ci) bzw dUR³H (100 μ l $\hat{=}$ 55 μ Ci) und Trennung der Nukleotide dUR, dUMP + TMP, TDP und TTP. Die Zellen wurden unterschiedlich lange 10 min. bzw. 30 min. bzw. 60 min. inkubiert. Kanäle ¹⁴C (³H) und ³H (¹⁴C).

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, vergrößern sich die punktförmig aufgetragenen Nukleotide dUR, dUMP + TMP, TDP und TTP beim Wandern mit Fließmittel fleckförmig. Sie wandern unterschiedlich weit. Je weniger energie - reich die einzelnen Nukleotide sind, d.h. je geringer ihre Phosphorylierung, desto weiter wandern sie mit Fließmittel. Entsprechend ist dUR nach dem Entwickeln vom Auftragungsort am weitesten entfernt.

Die mit dem Packard - Radiochromatogramm aufgezeichnete Radioaktivität der markierten Nukleotide verteilt sich über den gesamten Nukleotidfleck. Sie ist in der Mitte des Nukleotidfleckes am größten. Unterschiedlich hoch ist die Radioaktivität der einzelnen Nukleotidflecke. Sie ist am größten bei dUR und am geringsten bei dUMP + TMP. Dies wird durch die Messung der ausgeschnittenen Nukleotide im Tricarb - Scintillations - Spectrometer bestätigt (siehe Tab. III, Seite 17).

Bei der vom Packard - Radiogramm aufgezeichneten Radio - aktivität zwischen den Nukleotidflecken TDP und dUMP + TMP handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt, das nicht identifiziert werden konnte.

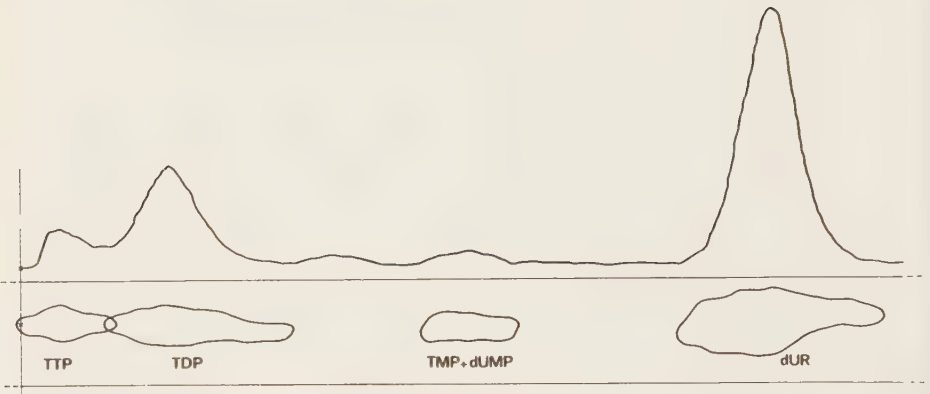


Abb.2:

Trennung der Nukleotide dUR, dUMP + TMP, TDP und TTP
durch Papierchromatographie

oberer Bildteil:

Radiochromatogramm

unterer Bildteil:

Darstellung der inaktiven Reverenz-
substanzen unter UV-Bestrahlung

IV. Untersuchungen des Einbaus von ^3H und ^{14}C markiertem Desoxyuridin (dUR) in Ehrlich Ascites Tumorzellen (EAT) mit Hilfe der Doppelpel - Isotopen - Markierungsmethode.

Abb. 3 zeigt die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten, die durch Zusammen - geben der Kontroll- und Probezellen nach Inkubation mit dUR ^{14}C (100 μl $\hat{=}$ 5 μCi) bzw. dUR ^3H (10 μl $\hat{=}$ 10 μCi) erreicht wurden. Die Werte ergeben sich aus drei Versuchen (a, b, c). Bei Versuch a wurden alle Probezellen 10 min., bei Versuch b alle Probezellen 30 min. und bei Versuch c alle Probezellen 60 min. mit dem markierten Prekursor inkubiert. Versuchsablauf siehe "Material und Methode".

Die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten der DNS steigen mit zunehmender Inkubationszeit proportional an. Das heist, mit zunehmender Inkubationszeit wird mehr ^3H markierter Prekursor in die DNS der EAT - Zellen eingebaut. Diese Feststellung lässt sich bei den einzelnen Nukleotiden nicht nachweisen. Die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten der Nukleotide steigen mit zunehmender Inkubationszeit nicht an, sondern fallen gering ab. Der Einbau von Radioaktivität in die einzelnen Nukleotide ist bei einer Inkubationszeit von 10 min. relativ am größten und nimmt mit steigender Inkubationszeit ab. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Chi - Bom Chae et al (6).

Abb. 4 zeigt die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten, die durch Zusammen - geben der Kontroll- und Probezellen nach Inkubation der EAT - Zellen mit dUR ^{14}C und dUR ^3H ermittelt wurden. Die Werte ergeben sich aus drei gleichen Versuchen. Im Gegensatz zu den Versuchen von Abb. 3, wo alle nur eine Inkubations - zeit hatten, wurden jetzt in jedem der drei Versuche ein Drittel der Kontrollzellen 10 min., ein Drittel 30 min. und ein Drittel 60 min. mit den Prekursoren inkubiert. Da - durch sollte ausgeschaltet werden, daß die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten dadurch verfälscht wurden, daß die EAT - Zellen die markierten Prekursoren unterschiedlich stark einbauen. Der unterschiedliche Einbau könnte durch unterschiedliche Qualität der EAT - Zellen für die einzelnen Versuche durch Abkunft von verschiedenen Mäusen zustande kommen. Da nun

in allen Versuchen die EAT - Zellen sowohl 10 min als auch 30 min als auch 60 min mit den markierten Prekursoren inkubiert werden, ist die Qualität der EAT - Zellen als gleichmäßig zu betrachten.

Wie in Abb. 4 ersichtlich, steigen die DNS - Werte bei einer Inkubationszeit von 30 min. gegenüber der von 10 min an. Entgegen Abb. 3 steigt der DNS - Wert bei einer Inkubationszeit von 60 min nicht weiter an, sondern fällt eher gering ab. Der Einbau des markierten Prekursors steigt also nicht mehr proportional der Inkubationszeit, sondern hat sein Maximum schon vorher erreicht und bleibt nun nahezu konstant. (Vergl. Cancer Research 30, 2652 - 2660, Nov. 70). Die Nukleotid - Werte stimmen mit denen von Abb. 2 fast überein. Eine Änderung des Einbaus von Radioaktivität hat bei den Nukleotiden nicht stattgefunden.

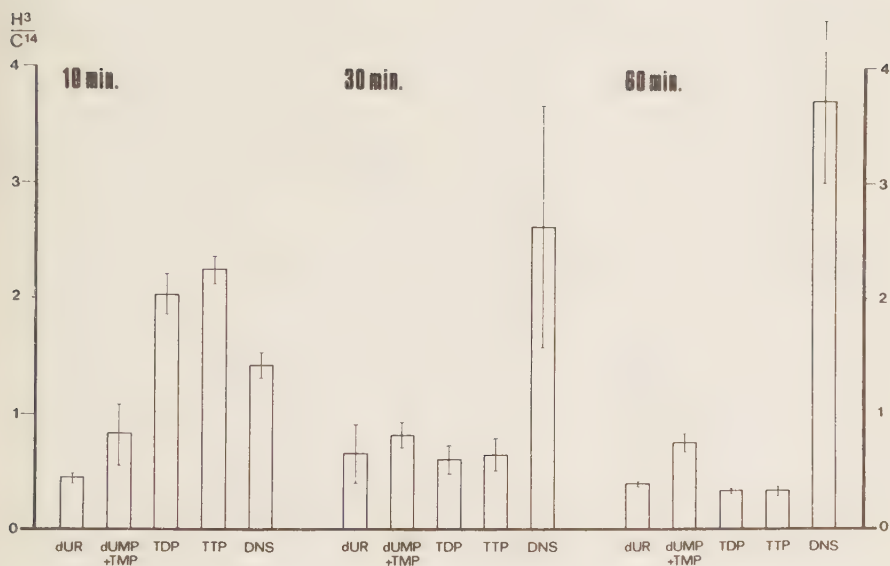


Abb. 3:

$^3H/^{14}C$ - Quotienten der radioaktiven Nukleotide und der DNS in EAT - Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit mit $dUR^{14}C$ ($100 \mu l \hat{=} 5 \mu Ci$) und dUR^3H ($10 \mu l \hat{=} 10 \mu Ci$). Die Werte ergeben sich aus drei verschiedenen Versuchen. Die Versuche unterscheiden sich in ihrer Inkubationszeit. (10 min, 30 min und 60 min)

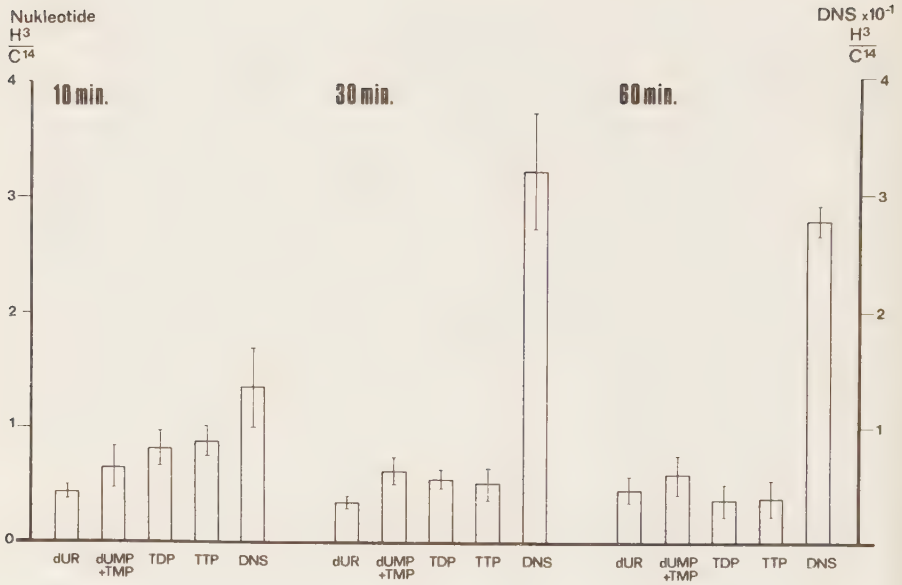


Abb.4:

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotient der radioaktiven Nukleotide und der DNS in EAT - Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit mit dUR^{14}C ($100 \mu\text{l} \hat{=} 5 \mu\text{Ci}$) und dUR^3H ($10 \mu\text{l} \hat{=} 10 \mu\text{Ci}$). Die Werte ergeben sich aus drei gleichen Versuchen. Innerhalb eines jeden Versuches wurden drei unterschiedliche Inkubationszeiten angewandt.

V. Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese mit Methotrexat

Abb. 5 zeigt Ergebnisse, die sich mit und ohne Zugabe von Methotrexat als Hemmstoff ergaben. Mit zunehmender Inkubationszeit werden die DNS - Werte der gehemmten Ansätze geringer gegenüber den DNS - Werten der ungehemmten Ansätze. Die Differenz zwischen gehemmten DNS - Werten und ungehemmten DNS - Werten ist bei einer Inkubation von 60 min am größten. Daraus ergibt sich, daß der Einbau des markierten Prekursors in die DNS der zunehmenden Inkubationszeit proportional durch Methotrexat gehemmt wird.

Die Nukleotid - Werte der gehemmten Ansätze verändern sich gegenüber den Werten der ungehemmten Ansätze statistisch nicht signifikant. Aus Abb. 5 geht hervor, daß Methotrexat die DNS - Synthese hemmt und die Hemmung der DNS - Synthese der Inkubationszeit proportional ist. Wo diese Hemmung im Zwischenstoffwechsel stattfindet, ist aus den Werten nicht ersichtlich.

VI. Einfluß von Bleomycin auf die Markierung des Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Syntheseweges

Abb. 6 zeigt Ergebnisse, die sich mit und ohne Zusatz von Bleomycin als Hemmstoff ergaben. Ähnlich den Hemmversuchen mit Methotrexat (vergl. Abb. 5), verringern sich die DNS - Werte der mit Bleomycin gehemmten Ansätze gegenüber den DNS - Werten der ungehemmten Ansätze. Die Differenz zwischen gehemmten und ungehemmten DNS - Werten ist bei einer Inkubationszeit von 60 min am größten.

Auch die Nukleotidwerte der mit Bleomycin gehemmten Ansätze verändern sich, wie schon bei der Hemmung mit Methotrexat gesehen (vergl. Abb. 5), nur gering. Würde der Zwischenstoffwechsel durch Bleomycin an einer Stelle geblockt, so sollte der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotient der Zwischenprodukte vor dem Block höher sein als derjenige eines Zwischenproduktes hinter demselben Block. Eine solche Erhöhung des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten eines Nukleotids ist in Abb. 6 nicht zu erkennen.

Bleomycin hemmt also die DNS - Synthese und diese Hemmung ist der Inkubationszeit proportional. Der Ort der Hemmung im Stoffwechsel ist nicht erkennbar.

VII. Einfluß von Methotrexat und Bleomycin auf die Markierung des Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Syntheseweges

Abb. 7 zeigt Ergebnisse, die sich mit und ohne gleichzeitige Zugabe von Bleomycin und Methotrexat als Hemmstoff ergaben. Wie schon bei den Hemmversuchen mit Bleomycin (vergl. Abb. 6) als auch mit Methotrexat (vergl. Abb. 5), verringern sich nur die DNS - Werte der gehemmten Ansätze gegenüber den DNS - Werten der ungehemmten Ansätze. Es ist eine proportional der Inkubationszeit verlaufende Hemmung der DNS - Synthese.

Ein Hemmeffekt der DNS - Synthese wurde schon mit Bleomycin und auch mit Methotrexat allein erreicht. (vergl. Abb. 5 + 6) Da hier beide Hemmstoffe kombiniert angewandt wurden, konnte mit einer Addition oder sogar Potenzierung der Hemmeffekte gerechnet werden. Diese Erwartung bestätigen die Versuche nicht. Wie Abb. 7 zeigt, liegt der Hemmeffekt bei Zugabe von Bleomycin plus Methotrexat nicht höher als bei der Zugabe nur eines der beiden Hemmstoffe.

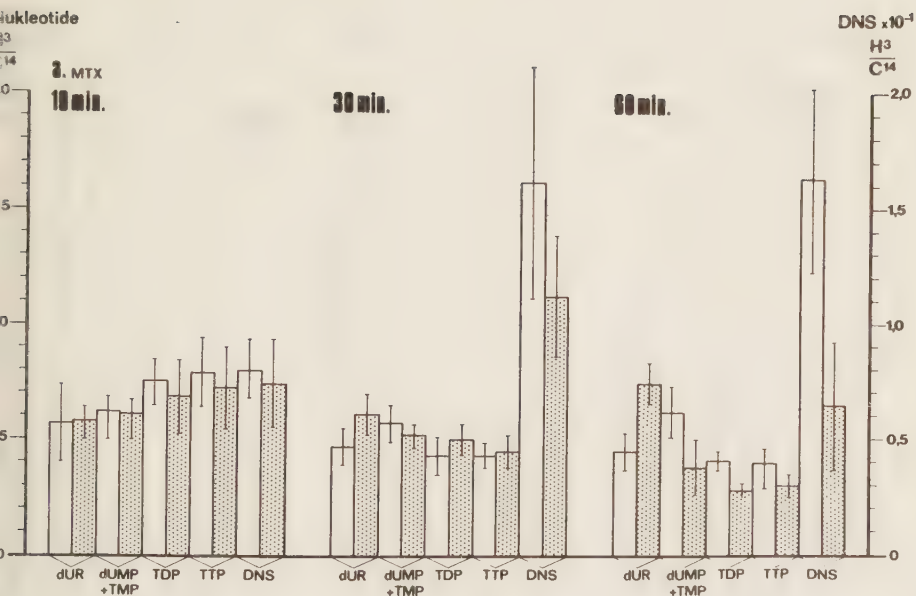


Abb.5:

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotient nach Zugabe von Methotrexat (10^{-4}M/l) zu den EAT - Zellsuspensionen im Vergleich zu den $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotienten ohne Zugabe von Methotrexat zu den EAT - Zellsuspensionen. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei verschiedenen Versuchen.

offene Säulen: $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotient der Ansätze ohne Hemmstoff

gepunktete Säulen: $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Quotient bei Hemmung der ^3H - Ansätze mit MTX (10^{-4}M/l)

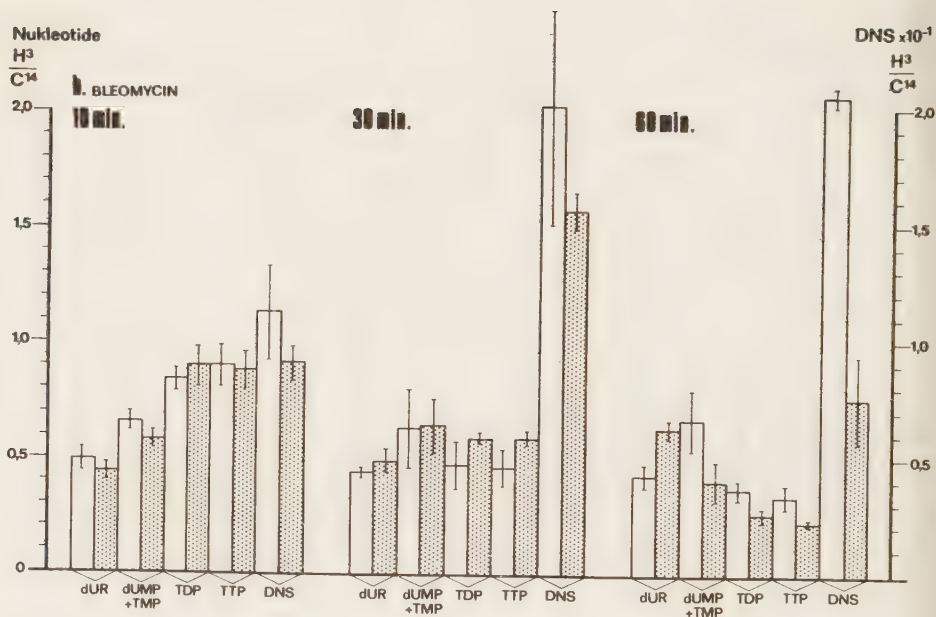
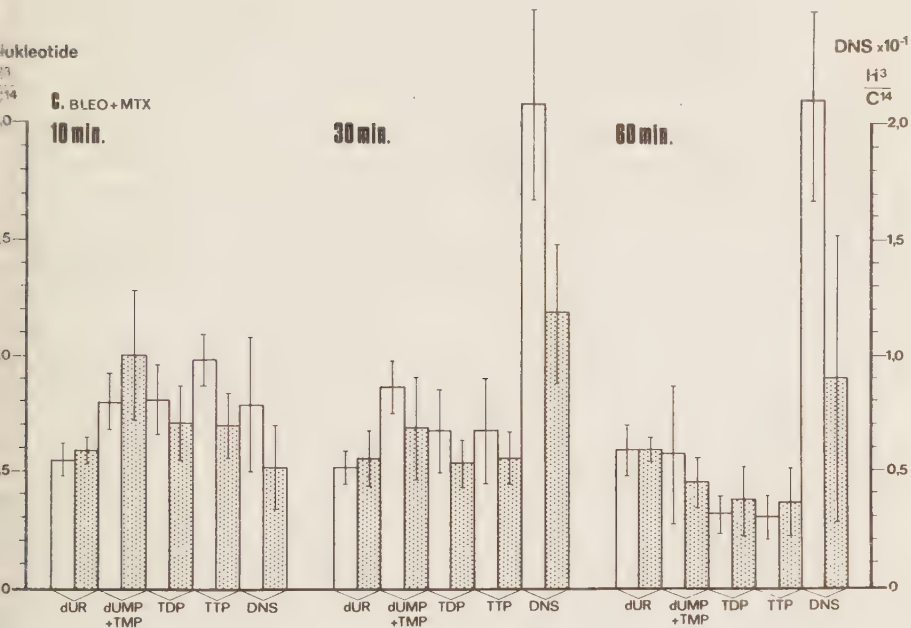


Abb.6:

$^3H/^{14}C$ - Quotient nach Zugabe von Bleomycin (100 $\mu g/ml$)
zu den EAT - Zellsuspensionen im Vergleich zu den $^3H/^{14}C$
- Quotienten ohne Zugabe von Bleomycin zu den Zellsuspensionen.
Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen.

offene Säulen: $^3H/^{14}C$ - Quotient der Ansätze ohne
Hemmstoff

gepunktete Säulen: $^3H/^{14}C$ - Quotient bei Hemmung der ^3H -
Ansätze mit Bleomycin (100 $\mu g/ml$)



D. Diskussion

Methotrexat und Bleomycin sind Zytostatika, die allein auf Plattenepithelkarzinome angewandt, jeweils bis zu 60 % Remissionen bzw. Teilremissionen hervorrufen (5,17). Diese klinischen Befunde führten dazu, die Kombination dieser Medikamente auf Plattenepithelkarzinome anzuwenden und zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, auf molekularer Ebene festzustellen, in welcher Weise die Kombination Methotrexat plus Bleomycin den DNS - Gehalt von EAT - Zellen beeinflusst. Gleichzeitig sollte möglichst die Stelle gefunden werden, an der Bleomycin in den Stoffwechsel der Zelle eingreift und ihn hemmt.

Die Wirkung von Methotrexat auf den Stoffwechsel ist bekannt: Es hemmt die DNS - Synthese, indem es Dihydrofolsäure kompetitiv aus der Proteinbindung verdrängt. Damit ist die Methylierung des Desoxyuridin - 5' - Monophosphat (dUMP) zu Thymidin - 5' - Monophosphat (TMP) gestört (38,40,41) (Abb.1). Bei unseren Versuchen mit Methotrexat (Abb.5) mußte dieser Hemm-Mechanismus dadurch sichtbar werden, daß die Nukleotidkonzentration vor dem Block, den Methotrexat verursacht, ansteigt. Dieser Anstieg käme dadurch zustande, daß die Nukleotide vor dem Block aufgestaut würden, da ja die Stoffwechselkette an einer Stelle unterbrochen ist. Die Nukleotidkonzentration hinter dem Block müßte dann entsprechend abfallen, da der Nachschub blockiert ist. Vergleichen wir diese theoretischen Überlegungen mit unseren Versuchen (Abb. 5), so finden wir aber keine Übereinstimmung. Die Nukleotidkonzentrationen der gehemmten Ansätze verändern sich gegenüber den ungehemmten Ansätzen nicht in signifikanter Weise. Eine Hemmung der DNS - Synthese aber hat stattgefunden, wie an den DNS - Konzentrationsunterschieden zwischen gehemmten und ungehemmten Ansätzen deutlich zu erkennen ist. Diese Hemmung wird um so stärker, je länger die Inkubationszeit ist. Methotrexat hemmt somit die DNS - Synthese proportional der Inkubationszeit. Da aber bei den Nukleotidwerten die erwarteten Veränderungen

ausbleiben, müssen hier Rückkopplungsmechanismen in Erscheinung treten (s.u.), die so schnell für einen Ausgleich der Konzentrationsunterschiede sorgen, daß sie mit unserer Methode nicht mehr signifikant werden.

Für Bleomycin ist der genaue Hemmeffekt noch nicht geklärt. Zwei Hemm-Mechanismen stehen zur Debatte: einmal soll durch Bleomycin die DNS - Polymerase gehemmt werden, also der Schritt Thymidin - Triphosphat (TTP) zu Desoxyribonucleinsäure (DNS)(Abb.1), zum anderen soll Bleomycin die bereits fertigen DNS - Moleküle zerstören (10,11, 18 - 27, 32 - 34, 36 - 39). Wenn Bleomycin mit dem Enzym DNS - Polymerase interferieren wurde, mußte in unseren Versuchen ein Konzentrationsanstieg bei den Nukleotiden, besonders bei Thymidin - Triphosphat (TTP) zu verzeichnen sein. Daß Bleomycin in seiner Wirkung effektiv ist, zeigt in unseren Versuchen der Konzentrationsunterschied der gehemmten Ansätze. Auch hier findet sich wieder ein der zunehmenden Inkubationszeit proportionaler Abfall des DNS - Gehaltes der EAT - Zellen (Abb. 6). Bei den Nukleotiden dagegen erzeugt Bleomycin in unseren Versuchen keinen Konzentrationsunterschied von gehemmten und ungehemmten Ansätzen, der auf einen möglichen Block durch Bleomycin hinweisen würde. Dies könnte zu dem Schluß führen, daß Bleomycin keine Wirkung auf die DNS - Polymerase hat, sondern daß es die DNS - Moleküle direkt zerstört. Doch wäre dieser Schluß voreilig, da ja schon die Versuche mit Methotrexat gezeigt haben, daß mögliche Rückkopplungseffekte den wirklichen Hemmmechanismus verschleiern können. So wurde beispielsweise mehrfach gezeigt (3,4,16,29,40,41), daß ein Anstieg des Thymidin - Triphosphates mehrere allosterische Effekte verursacht: einmal wird die Thymidin - Kinase gehemmt, wodurch der Schritt Thymidin zu Thymidin - Triphosphat unterbrochen wird, zum anderen wird die Desoxycytidylat - Desaminase gehemmt, also der Schritt Desoxycytidin - Monophosphat zu Desoxyuridin - Monophosphat und zum dritten wird der Schritt Desoxyuridin zu Desoxyuridin - Monophosphat gehemmt (Abb. 1)

Dieser letzte Effekt scheint hier der wichtigste zu sein und kann die Erklärung für das Ausbleiben eines Anstieges der Nukleotidkonzentration sein. Mit unseren Versuchen kann also nur bestätigt werden, daß Bleomycin eine zytostatische Wirkung besitzt. Es kann nicht geklärt werden, an welcher Stelle im Stoffwechsel diese Wirkung eintritt.

Die alleinige Anwendung der Zytostatika Methotrexat und Bleomycin führte jeweils zu einer Verringerung des dUR ^3H - Einbaus in die DNS. Diese Verringerung war relativ um so größer, je länger die Inkubationszeit war. Wir fanden also eine der Inkubationszeit proportionale Hemmung. Betrachten wir nun die Ergebnisse der Versuche, die mit der Kombination von Methotrexat plus Bleomycin unternommen wurden, so stellen wir fest, daß keine zusätzliche Hemmung zu verzeichnen ist. Die erzielte Hemmung ist nicht höher als bei den Versuchen, bei denen Methotrexat bzw. Bleomycin alleine angewendet wurden. Eine Addition oder gar Potenzierung der Hemmeffekte ist nicht eingetreten. Diese Ergebnisse fänden eine Erklärung, wenn Bleomycin in die DNS - Synthese eingreift und die DNS - Polymerase hemmt. Bleomycin würde somit wie Methotrexat wirken, da es im selben Stoffwechselweg eingreift, wenn auch an anderer Stelle.

- Nach Handschuhmacher (12) nämlich ist die Leistungsbilanz einer Reaktionskette abhängig von ihrem langsamsten Schritt. - Von beiden Zytostatika ist somit das stärker wirksamere ausschlaggebend für die Größe des Hemmeffektes. Bei den verwendeten Konzentrationen der Zytostatika bestimmt in unseren Versuchen Methotrexat das Ausmaß der Hemmung.

Wenn mit unseren Versuchen Handschuhmacher bestätigt wird, kann die kombinierte Anwendung der Zytostatika Methotrexat und Bleomycin nur die gleiche Hemmung aufweisen wie die alleinige Anwendung von Methotrexat, nicht aber eine Addition oder gar Potenzierung der Hemmung erreichen.

Andererseits wiederum konnte Litter mit seinen Untersuchungen an Yoshida - Sarkomen nachweisen, und zwar sowohl durch Untersuchungen im zellulären Bereich als auch an lebenden, tumor -

tragenden Tieren, daß sich bei kombinierter Anwendung von Methotrexat und Bleomycin die Wirkungen potenzieren (1). Auch sprechen seine guten Ergebnisse im klinischen Bereich - 70 % vollständige Remissionen bei kombinierter Anwendung von Methotrexat plus Bleomycin gegenüber 30 % vollständige - und 30 % Teilremission bei alleiniger Anwendung von Bleomycin und 60 % Teilremission bei alleiniger Anwendung von Methotrexat - für das Auftreten überadditiver Hemmeffekte, wenn auch hier der endgültige Beweis schwerlich zu führen ist.

Die Frage, ob eine Potenzierung der Hemmeffekte auch bei unseren Experimentaltumoren (EAT) erreicht, aber mit unserer Methode nicht sichtbar gemacht werden konnte, oder ob eine Potenzierung nur bei bestimmten Tumorarten auftritt, muß hier offen bleiben.

E. Zusammenfassung

Die alleinige Anwendung der Zytostatika Methotrexat und Bleomycin auf Plattenepithelkarzinome führt zu einer Remission bis zu 60 %. Von der kombinierten Anwendung beider Zytostatika erhofft man sich eine Addition bzw. Potenzierung ihrer Hemmeffekte.

In dieser Arbeit wurde auf molekularem Bereich untersucht, ob die kombinierte Anwendung von Methotrexat und Bleomycin die erhofften Hemmeffekte erzielt. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, wo Bleomycin in den Zellstoffwechsel eingreift. Die Versuche, die an Experimentaltumoren durchgeführt wurden, ergaben:

- 1.) Die Anwendung von Methotrexat führt zu einer Hemmung der DNS - Synthese. Die Hemmung verläuft proportional der Inkubationszeit.
- 2.) Wird Bleomycin als Hemmstoff benutzt, verringert sich der DNS - Gehalt ähnlich wie bei Methotrexat.
- 3.) Die Kombination beider Zytostatika ruft keine weitere Hemmung hervor, als sie schon bei der Anwendung nur eines Hemmstoffes erreicht wurde.

Ob Bleomycin die DNS - Polymerase hemmt, oder direkt die fertigen DNS - Moleküle zerstört, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da in unseren Versuchen die Nukleotidwerte, trotz Abnahme der DNS - Werte, keine Veränderungen zeigten.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. BITTER, K.:

Wirkung der Bleomycin-Methotrexat-Kombination
auf experimentelle Tumoren und auf Plattenepithel-
Karzinome der Mundhöhle
Habilitationsschrift FU Berlin (1975)

2. BONADONNA, G. und Mitarb.:

Clinical trial with Bleomycin in lymphomas and
in solid tumors
Europ. J. Canc. 2, 205 (1972)

3. BREITMANN, T. R.:

The feedback inhibition of thymidine kinase
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 67, 153 - 155
(1963)

4. BRESNICK, E., KARZALA, R. J.:

End-produkt inhibition of thymidine kinase
activity in normal and leucemic leucocytes
Cancer Res. 24, 841 - 846 (1964)

5. CAPIZZI, R. L. u. Mitarb.:

Methotrexate Therapy of Head and Neck Cancer:
Improvement in Therapeutic Index by the use of
Leucovorin "Rescue"
Cancer Res. 6, 1782 (1970)

6. CHI-BOM CHAE, u. Mitarb.:

Inhibition of Thymidine Phosphorylation and
DNA and Histone Synthesis in Ehrlich Ascites
Carcinoma
Cancer Res. 30, 2652 - 2660 (1970)

7. DESPEREZ, J.D. u. Mitarb.:

Response of oral carcinoma to preoperative
Methotrexate infusion therapy
The Am. J. Surg. 120, 4, 461, (1970)

8. E.O.R.T.C.:

Study of the clinical efficiency of Bleomycin in human cancer

Brit. med. J. 2, 643 (1970)

9. FRIEDMANN, M. u. Mitarb.:

Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck with combined Methotrexate and Irradiation

Cancer 3, 711 (1970)

10. FUJII, A. u. Mitarb.:

Chemistry of Bleomycin. XI. The structures of the terminal mines

J. Antibot. V 26 (1973)

11. HAIDLE, Ch. W. u. Mitarb.:

Nucleic acid-specificity of Bleomycin

Biochem. Pharmacol. 21, 24, 3308 (1972)

12. HANDSCHUMACHER, R.E.:

Some Enzymatic Considerations in Combination Chemotherapy

Cancer Res. Vol 25 1541 - 1543 (1965)

13. PIROSHI, Y. u. Mitarb.:

Effects of Bleomycin A on deoxyribonuclease, DNA polymerase and ligase reactions

The J. Antibiotics 3, 178 (1971)

14. HRYNIUK, W.M. u. Mitarb.:

S-Phase Cells of Rapidly Growing and Resting

Populations. Differences in Response to Methotrexate

Molec. Pharmacol. 6, 557 (1969)

15. ISHIKAWA, T. u. Mitarb.:

Statistical observations on the side-effects of Bleomycin

I. Nation. Hospital, Tokyo (1968)

16. IVES, D. H. u. Mitaro.:

Feed back inhibition of thymidine kinase by
thymidin triphosphate

J. biol. Chem. 238, 1467 - 1474 (1963)

17. KENO, T.:

Clinical Trial of Bleomycin for Squamous Cell
Carcinoma of the Mouth as carried out in 17
Hospitals

6th Congress of Japan. Soc. for Cancer Therapy,
Tokyo (1968)

18. KOBAYASHI, T.:

Reduced activity of DNA polymerase from Bleomycin -
treated cancer cells

J. Antibiot. 8, 519 (1971)

19. KOYAMA, G. u. Mitarb.:

The chemistry of bleomycin. X. The stereochemistry
and crystal structure of β -hydroxynistidine, an
amine component of bleomycin

J. Antibiot. V. 26, 2, 109 (1973)

20. KRUEGER, W. C. u. Mitarb.:

Interactions of DNA with zorbamycin, phleomycin
and bleomycin; ultraviolet absorption and circular
dichroism measurements

J. Antibiot. V. 26, 8, 424 (1973)

21. MIYAKI, M. u. Mitarb.:

Breakage of DNA-membrane complex by bleomycin

J. Antibiot. V. 27, 9, 647 (1974)

22. MIYAKI, M. u. Mitarb.:

Single strand scission and repair of DNA in
Bleomycin - sensitive and resistant ascites
hepatoma cells

J. Antibiot. V. 26, 7, 369 (1973)

23. MÜLLER, W.E.G. u. Mitarb.:

Action of Bleomycin on DNA and RNA
Eur. J. Biochem. V. 3, 3, 518 (1972)

24. MÜLLER, W.E.G. u. Mitarb.:

Action of bleomycin on programmed synthesis.
Influence on DNA and RNA nucleases
FEBS Lett. V. 31, 2, 217 (1973)

25. MÜLLER, W.E.G. u. Mitarb.:

Bleomycin, a selective inhibitor of DNA - dependent polymerase from oncogenic RNA viruses
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4 , 1667 (1972)

26. NAKAMURA, H. u. Mitarb.:

Chemistry of bleomycin XIII
J. Antibiot. 27, 5, 352 u. 356 ff (1974)

27. OMOTO, S. u. Mitarb.:

The chemistry of bleomycin, VIII. The structure of the sugar moiety of bleomycin A₂
J. Antibiot. V. 25, 12, 752 f, 755 f (1972)

28. PAPAC, R. u. Mitarb.:

Methotrexate in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
II. Intermittent Intravenous Therapy
Cancer Chemother. Rep. 51, No.2, 69 - 72 (1967)

29. ROY, P. u. Mitarb.:

Analogues of Nucleic-Acid Components
Recent Results in Cancer Research (1970)

30. SANDBERG, J.S. u. Mitarb.:

L The use of Leucovorin orally in normal and leukemic L 1210 mice to prevent the toxicity and gastrointestinal lesions caused by high doses of Methotrexate
Cans. Res. 30, 1276 (1970)

31. SULLIVAN, R.D. u. Mitarb.:

A study of the Distribution of Methotrexate in Human Tissues and Tumors

Cancer Res. 30, 1344 (1970)

32. SULLIVAN, R.D. u. Mitarb.:

Reevaluation of Methotrexate as an Anticancer Drug

Surg. Gyn. Obstetr. 10, 819 - 824 (1967)

33. SUZUKI, H. u. Mitarb.:

Of the mechanism of action of bleomycin.
Strand scission of DNA caused by bleomycin
and its binding to DNA in vitro

The J. Antibiotics 10, 473 (1970)

34. TANAKA, N.:

Inhibition of transcription by pluramycin
and bleomycin

The J. Antibiotics 11, 523 (1970)

35. TOYOZO, T.:

Lethal effect of bleomycin on cultural mammalian
cells.

J. of Antibiot. 6, 300 (1970)

36. UMEZAWA, H. u. Mitarb.:

The effect of bleomycin on SV 40 DNA: characteristics
of bleomycin action which produces a single scission
in a superhelical form of SV 40 DNA

J. Antibiot. V 26, 9, 521 (1973)

37. UMEZAWA, H.:

Chemistry and mechanism of action of bleomycin

Federation Proc. V. 33, 11, 2296 (1974)

38. VOGLER, W.R.:

Toxic and therapeutic effects of methotrexate-folinic
acid (leukovorin) in advanced cancer and leukemia

Cancer 4, 894 (1971)

39. WATANABE, M. u. Mitarb.:

Response in macromolecular syntheses of mouse
L. cells to bleomycin, with special reference
to cell antibiotic interaction

J. Antibiot. V. 26, 8, 417 (1973)

40. WILMANNS, W. u. Mitarb.:

DNS - Synthese in Leukämiezellen unter der Ein-
wirkung von Methotrexat, 5-Fluoruracil und Cytosin-
Arabinosid in vitro

Klin. Pharm. 2, 161 - 166 (1970)

41. WILMANNS, W.:

The Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen
Zellen.

Klin. Wo. 45, 505 (1967)

42. YAMAKI, H. u. Mitarb.:

Effects of bleomycin A₂ on desoxyribonuclease,
DNA polymerase and ligase reactions

The J. Antibiot. 3, 178 (1971)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Kieferchirurgie im Klinikum Steglitz (Leiter: Prof. Dr. Dr. R. Stellmach) des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin unter der Leitung vom Herrn Privatdozent Dr. Dr. K. Bitter durchgeführt.

Herrn Privatdozent Dr. Dr. Klaus Bitter möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit aufrichtig danken.

Lebenslauf

Am 16.11.1943 wurde ich, Gerhard Martschke, als zweiter Sohn des damaligen Regierungsassessors Georg Paul Gerhard Martschke und seiner Ehefrau Gertrud Martschke, geb. Ziegenbalg, in Bautzen/Sachsen geboren.

In Köln besuchte ich ab 5.4.1951 die Volksschule und anschließend das städt. Gymnasium. Am 18.2.1961 verließ ich das Gymnasium um eine zahntechnische Lehre zu beginnen. Nach dreieinhalbjähriger Lehre legte ich am 3.10.1964 mit Erfolg die Gesellenprüfung ab.

Da mich diese handwerkliche Tätigkeit allein nicht befriedigte, beschloß ich, über den zweiten Bildungsweg das Hochschulstudium der Zahnmedizin vorzubereiten. Zu diesem Zweck besuchte ich ab 1.10.1964 die Berufsaufbauschule Köln-Deutz. Am 31.3.1966 erlangte ich das Zeugnis der Fachschulreife. Danach besuchte ich ab 2.5.1966 das Köln-Kolleg, Institut zur Erlangung der Hochschulreife und legte hier am 28.8.1968 die Abiturprüfung ab.

Zum Wintersemester 1968/69 und Sommersemester 1969 bewarb ich mich erfolglos um das Studium der Zahnmedizin. Während dieser Zeit arbeitete ich daher in meinem erlernten Beruf. Zum Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Zahnmedizin in Berlin. Im Februar 1975 bestand ich die zahnärztliche Prüfung.

Seit 1971 bin ich mit dem Reisebürokaufmann Barbara Ruland verheiratet.

Im August 1973 begann ich meine Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Dr. Klaus Bitter im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

Seit Juni 1975 arbeite ich als Assistent bei dem Zahnarzt Stephan Schiffer in Bonn.

